

胶体金免疫层析定性检测试剂的质量控制与评价

李颖, 李丽莉* (中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局体外诊断试剂质量研究与评价重点实验室, 北京 100050)

摘要 **目的:** 探讨胶体金免疫层析定性检测试剂质量控制技术关键要求, 为生产企业、检验机构质量控制及评价提供参考, 有效地促进该类体外诊断试剂质量水平的提高。**方法:** 结合胶体金免疫层析定性检测试剂质量标准要求及分类管理, 对该类试剂质量的关键性能要素进行剖析, 提出相应建议, 提高试剂质量。**结果与结论:** 质量控制与评价是贯穿产品全流程的核心要素, 膜条宽度、液体移行速度、阴性符合率、阳性符合率、检出限、重复性是胶体金免疫层析定性检测试剂质量控制及评价的关键性能指标, 对于试剂的质量至关重要。相关生产研发企业要合理设计性能要求, 完善质量管理体系; 检验机构要根据产品性能要点做好质量评价; 监管部门要根据行业需要和监管需要, 加快标准制修订工作, 加强上市后监管; 从生产、检验及监管各环节对这些关键性能指标进行控制, 提高试剂的质量标准, 从而满足临床和监管的需求。

关键词: 胶体金免疫层析; 质量控制; 体外诊断试剂

中图分类号: R97 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)01-0053-005
doi:10.16153/j.1002-7777.2024.01.007

Quality Control and Evaluation of Colloidal Gold Immunochromatography Qualitative Detection Reagents

Li Ying, Li Lili* (National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of In Vitro Diagnostics, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To discuss the key requirements of quality control technology for colloidal gold immunochromatography qualitative detection reagents, aiming to provide reference for quality control and evaluation of production enterprises and inspection institutions, and effectively promote the quality level of such *in vitro* diagnostic reagents. **Method:** Based on the quality standard requirements and classification management of colloidal gold immunochromatography qualitative detection reagents, analyze the key performance elements of this type of reagent quality, put forward corresponding suggestions, improve reagent quality. **Results and Conclusion:** Quality control and evaluation are the core elements that run through the entire product process. Membrane width, liquid migration speed, negative compliance rate, positive compliance rate, detection limit and repeatability are the key performance indicators for quality control and evaluation of colloidal gold immunochromatography qualitative detection reagents, which are crucial for the quality of reagents. Relevant production and R&D enterprises should reasonably design performance requirements and improve quality management systems, inspection agencies should conduct quality evaluations based on the key product performance points, regulatory authorities should accelerate the revision of standards and strengthen post listing supervision based on industry and regulatory needs. Control these key performance indicators from various aspects of production, inspection, and supervision to

improve the quality standards of reagents, so as to meet the clinical and regulatory needs.

Keywords: colloidal gold immunochromatography; quality control; *in vitro* diagnostic reagents

胶体金免疫层析检测试剂是一类应用胶体金免疫层析技术 (Colloidal Gold-based Immunochromatography Assay, GICA) 进行疾病检测的体外诊断试剂^[1]。近年来, 凭借其操作简便、检验形式灵活、结果快速直观、成本低廉等优点, 被广泛应用于生物学中的病原体、药物、激素等的检测, 检测样本包括尿液、唾液、全血、血清、血浆、体液等, 适用于广大基层实验室或现场检验, 适合即时检验、人群筛查等^[2]。尤其在新型冠状病毒 (简称“新冠病毒”) 肺炎疫情这一突发公共卫生事件中发挥了重要作用, 成为突发传染病实现“四早”, 即早发现、早报告、早隔离、早治疗的重要检验手段。2022年3月11日, 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制综合组决定在核酸检测基础上增加抗原检测作为补充, 并组织制定了《新冠病毒抗原检测应用方案 (试行)》^[3], 明确了新冠病毒抗原检测试剂可以用于有抗原自我检测需求的社区居民。在国家药品监督管理局批准上市的新冠病毒抗原检测试剂中, 有50%以上试剂为胶体金免疫层析检测试剂。该方案的制定使得新冠病毒胶体金检测试剂在疫情防控中得到了广泛应用, 在即时检验领域得到进一步发展。本文仅针对临床疾病辅助诊断应用较广泛的胶体金免疫层析定性检测试剂, 根据其产品特点, 简述管理情况, 以各项质量标准要求为依据, 对其性能质控要点进行详尽的梳理, 并提出相关建议, 以期为企业、检验机构把握质量评价关键要素, 保障产品质量提供参考。

1 胶体金免疫层析定性检测试剂的监管情况

临床应用的胶体金免疫层析定性检测试剂日益繁多, 其快速发展引起监管部门的重视。根据我国《医疗器械监督管理条例》《体外诊断试剂注册与备案管理办法》等法规文件规定, 用于临床检测目的的胶体金免疫层析定性检测试剂属于按医疗器械管理的体外诊断试剂^[4-5]。为科学地管理这类体外诊断试剂, 监管部门制定了一系列国家及行业标准, 根据产品风险程度分类管理并加强产品上市后监管。

1.1 标准要求

为统一胶体金免疫层析定性检测试剂质量尺

度, 原国家食品药品监督管理总局于2013年发布《金标类检测试剂注册技术审查指导原则》, 针对金标类检测试剂的主要原材料、生产工艺及反应体系、产品质量控制等环节提出指导性技术要求^[6]。此后又相继制定了《心肌肌钙蛋白I/肌红蛋白/肌酸激酶同工酶MB检测试剂 (胶体金免疫层析法) 注册技术审查指导原则》《大便隐血 (FOB) 检测试剂盒 (胶体金免疫层析法) 注册技术审查指导原则》等多项技术审查指导原则, 以及YY/T 1220-2013《肌酸激酶同工酶(CK-MB)诊断试剂 (盒) (胶体金法)》、YY/T 1443-2016《甲型流感病毒抗原检测试剂盒 (免疫层析法)》、YY/T1713-2020《胶体金免疫层析法检测试剂盒》等多项行业标准, 基本建立起包括以胶体金免疫层析检测试剂技术为核心的注册审查指导原则、方法标准、产品标准在内的标准体系。尤其是2020年发布的属性为通用技术类的行业标准YY/T1713-2020《胶体金免疫层析法检测试剂盒》^[7], 对定性的胶体金免疫层析检测试剂质量要求、性能指标、检验操作方法进行了系统规范, 对产品研发、生产质量控制、产品质量评价、上市后监管以及使用者了解产品等具有重要指导作用, 实现了对胶体金免疫层析定性检测试剂更加科学的管理。

1.2 监管现状

按照原国家食品药品监督管理总局印发的《体外诊断试剂分类子目录》^[8], 体外诊断试剂产品风险程度由低到高分第一类、第二类、第三类产品。胶体金免疫层析定性检测试剂根据其检测靶标特异性, 风险管理类别分为第二类、第三类。第二类管理的产品主要有用于蛋白质检测、激素以及其他生理、生化或免疫功能指标检测的试剂, 例如肌红蛋白检测试剂 (胶体金法)、促甲状腺素检测试剂盒 (免疫层析法)、D-二聚体检测试剂 (胶体金法); 第三类管理的产品主要有与致病性病原体抗原、抗体以及核酸、肿瘤标志物、麻醉药品、精神药品、医疗用毒性药品检测相关的试剂, 例如幽门螺旋杆菌抗原检测试剂盒 (胶体金法)、尿核基质蛋白22 (NMP22) 检测试剂盒 (胶体金法)、苯二氮卓检测试剂盒 (胶体金法)。通过对胶体金免疫

层析检测试剂的分类, 规范和指导监督管理工作。

以往对于体外诊断试剂的监管重心主要集中在酶联免疫法、化学发光法类体外诊断试剂。而随着胶体金免疫层析试剂的发展, 国家药品监督管理局和地方药品监督管理局也加大了对该类试剂的上市后监管, 包括对相关试剂的监督抽检、生产体系的飞行检查等。从2019年到2023年, 国家共开展13项胶体金免疫层析试剂的监督抽检, 均为第三类管理试剂, 例如2023年梅毒螺旋体抗体检测试剂盒(免疫层析法)、2020年恶性疟原虫抗原检测试剂盒(胶体金法)。监管过程中也发现了产品质量以及生产风险点等方面的问题。例如国家药品监督管理局于2020年开展的恶性疟原虫抗原检测试剂盒(胶体金法)国家监督抽检, 共抽取上市后产品7批次, 检验发现1个生产厂家的4批次产品不合格, 对发现的产品质量问题作出相应的处罚。

监督抽检依据上市后产品技术要求, 对产品关键技术指标进行检验, 以此评判产品质量, 是加强产品监管的重要手段。由此可见, 把握胶体金免疫层析定性检测试剂性能质控要点, 对于质量控制与评价尤为重要^[9]。

2 胶体金免疫层析定性检测试剂性能质控要点

胶体金免疫层析定性检测试剂的性能质控要点一般包括: 物理性状(外观、膜条宽度和液体移行速度)、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、检出限、重复性、稳定性等性能指标。

2.1 物理性状

物理性状是胶体金免疫层析检测试剂实现检测性能的基本保障。物理性状指标包括外观、膜条宽度和液体移行速度。外观一般要求平整、材料附着牢固、各组分齐全^[10]; 膜条宽度及液体移行速度满足要求是产品性能实现的重要质控指标, 膜条宽度太窄会影响使用者的观察, 液体移行速度过快或过慢甚至停留在检测窗口中间部位, 都会影响结果的判读, 导致试验结果无效。因此, 产品首先应选用具有良好吸附性和滤过效率, 且适宜制备的胶体金颗粒的原材料, 并制定原材料筛选、验收的技术要求; 层析基质也要根据包被的抗原/抗体特性研制专用体系, 以确保结构稳定、量值准确, 从而发挥抗原/抗体的特异捕获功能; 再经适宜的工艺装配成胶体金卡槽, 以成品的膜条宽度及液体移行速

度作为物理性状评价指标^[11]。

2.2 阴性参考品符合率

阴性参考品符合率是评价试剂产品特异性的质控要点, 是指检测不含有检测物的不同阴性特异性参考品的检出率。YY/T1713-2020中要求检测的阴性参考品结果应均为阴性, 即阴性参考品符合率为100%; 尤其对病原微生物检测试剂的阴性参考品设置作出特殊规定, 应包括相对于待检测对象而言为阴性的正常人群的多份样本, 以及与该病原体感染途径相似或相同的其他病原体感染样本, 必要时还要开展分析特异性研究。例如, 新冠病毒抗原检测试剂国家阴性参考品包括其他常见的呼吸道病原体(例如副流感2型、乙型流感病毒和甲型H1N1(2009)流感病毒等), 《新型冠状病毒(2019-nCoV)抗原检测试剂注册审查指导原则(2023年修订版)》建议阴性参考品包括冠状病毒、流感病毒、肠道病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒等病原微生物, 并建议在病原体的医学相关水平进行交叉反应的验证, 例如病毒浓度为 10^5 pfu·mL⁻¹或更高; 《心肌肌钙蛋白I检测试剂(胶体金免疫层析法)注册技术审查指导原则》建议对抗原结构相近的物质进行交叉反应研究, 例如1000 ng·mL⁻¹心肌肌钙蛋白T、1000 ng·mL⁻¹心肌肌钙蛋白C、1000 ng·mL⁻¹骨骼肌型肌钙蛋白I; 《人绒毛膜促性腺激素检测试剂(胶体金免疫层析法)注册技术审查指导原则》建议交叉反应验证的激素为500 mIU·mL⁻¹人促黄体生成素(hLH)、1000 mIU·mL⁻¹人卵泡刺激素(hFSH)和1000 μIU·mL⁻¹人促甲状腺素(hTSH)。因此, 企业应根据产品特性科学地设置企业阴性参考品^[12]。建议在质控时, 有相关国家参考品的使用国家参考品, 或经国家参考品标化的企业参考品; 同时, 试剂盒应配制相应的阴性对照以供质控^[13], 避免出现假阳性的结果。

2.3 阳性参考品符合率

阳性参考品符合率是评价试剂产品准确性的质控要点, 是指检测含有检测物的不同阳性参考品的检出率。YY/T1713-2020中要求检测的阳性参考品结果应均为阳性, 即阳性参考品符合率为100%; 并且要求病原微生物检测试剂的阳性参考品应为被检测对象而言确诊为该病原体感染的多份样品, 阳性参考品选择时应能代表我国主要流行

的病原微生物型别,包括不同基因型/血清型的病原体或抗体。因此,企业应根据产品特性科学地设置企业阳性参考品,一般应包含强阳、中阳、弱阳参考品。例如,新冠病毒抗原检测试剂国家阳性参考品包括8份不同滴度水平的阳性参考品,采用热灭活和 β -丙内酯灭活两种方式评价试剂盒性能。建议在质控时,有相关国家参考品的使用国家参考品,或经国家参考品标化的企业参考品;同时,试剂盒应配制相应的阳性对照以供质控^[13],避免出现假阴性,保证结果的准确可靠。

2.4 检出限

检出限是定性检测试剂盒的一项关键指标,其浓度点的选择应符合临床实际诊断意义。检出限又称最低检出限,是指给定置信水平上能够检出被测物质的最小浓度或最小质量^[14],分别检测不同浓度/水平梯度的检出限参考品,其结果应满足制造商声称。 C_5 为5%被检样品可被判定为阳性时的分析物浓度; C_{95} 为95%被检样品可被判定为阳性时的分析物浓度;参考品应涵盖临界值两侧的 C_5 和 C_{95} 附近的浓度/水平,而最低检出限及灰区应根据不同的被测物及其临床应用情形设置,灰区内参考品的检测结果不作要求,高于 C_{95} 的检测结果应为阳,低于 C_5 检测结果应为阴。例如,人绒毛膜促性腺激素检测试剂(胶体金免疫层析法)检出限要求应不高于 $25 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$;心肌肌钙蛋白I检测试剂(胶体金免疫层析法)的检出限浓度为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (允许上限值),阴性检测浓度为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (允许下限值)。企业可依据其产品自身特点及临床实际需求在此范围内自定义其相应检测浓度。同样,如果相关产品有国家参考品,建议企业使用国家参考品或经国家参考品标化的企业参考品。此外,胶体金免疫层析检测试剂需要肉眼直接在白色膜条带上观察胶体金产生的信号,那么最低检出限的呈现就受到试剂灵敏度的局限。灵敏度低是限制胶体金免疫层析检测试剂应用范围的主要因素之一,企业可以通过增强信号强度来提高灵敏度,例如应用增敏剂,使检测线强度增加,从而改善灵敏度^[15]。

2.5 重复性

重复性即产品的重复测量,一般规定检测已明示浓度/水平的参考品至少10次,其结果符合率应不小于95%^[17]。YY/T1713-2020中要求应选择阴

性及弱阳性(C_5 、 C_{95} 附近浓度/水平)样品作为重复性参考品。重复性是检验产品质量稳定性的重要指标。胶体金免疫层析检测试剂的质量受到生产工艺、使用环境等因素影响,即使是同一批产品也很难保证每个试剂的同一性^[16],并且由于大部分定性试剂不使用仪器,仅凭肉眼观察,更需要对试剂的重复性进行严格把控。重复性项目的检验包括批内重复性和批间重复性,检测同一生产批次之间的重复性称为批内重复性,检测不同批次的重复性称为批间重复性,一般选择3个批次^[17]。建议企业及实验室在进行质控时应包括批内和批间重复性,若不满足批间要求的可不做批间重复性,但是必须检验批内重复性。

2.6 稳定性

稳定性包括效期稳定性、热稳定性、开封稳定性。胶体金免疫层析检测试剂的储存温度一般要求不高,通常存放在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下即可,有效期一般为1~2年。试剂的稳定性试验一般采用热稳定性试验,取有效期内试剂盒在规定的温度放置规定的时间后,检验其物理性状、阴性符合率、阳性符合率、最低检出限和重复性等关键质控要点,结果应符合要求;温度一般选择 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$,放置时间根据产品特性确定,对于有效期较长的试剂,其放置时间应根据企业的加速试验研究结果确定^[18]。

3 讨论

综上所述,胶体金免疫层析定性检测试剂通过标记的胶体金而显示检测带,呈现检测结果,判读主观性较大,容易出现假阴性、假阳性的情况,还存在检出限不符合要求、重复性指标显色不一致的问题,这些问题会对临床及患者产生各种影响,延误患者治疗时机,甚至威胁生命健康。如何把握质量控制及评价的关键性能指标,保障产品质量,提升性能,是涵盖生产、检验、监管各环节的关键问题。

3.1 提高产品质量是胶体金免疫层析定性检测试剂扩大应用领域的基本要求

随着临床应用范围的扩大和潜在市场的开发,胶体金免疫层析检测试剂检测项目日益增多,对其性能要求也在不断增加。但是,由于受到其技术本身的局限,相比其他检测方法,例如化学发光法、酶联免疫法等,胶体金免疫层析检测试剂存在灵敏度低、特异性差的问题^[19]。因此,在保证其优点的基

础上优化性能指标,改进现有的技术提高产品灵敏度、特异性,提高产品质量,使其更具重现性、更灵敏、更易制造、更易操作、检测浓度范围更广。

3.2 健全生产质量体系是胶体金免疫层析定性检测试剂产品质量稳定的基本保证

为确保胶体金免疫层析定性检测试剂的质量,相关企业应建立健全质量控制体系。产品技术要求作为产品质量评价的重要技术依据,是研制生产单位、监管部门、使用单位共同遵守的技术标准。科学设置产品技术指标,建立正确的检验操作方法,包括膜条宽度、液体移行速度、阴阳参考品符合率、检出限、重复性等检测项目,如有相应国行标,应不低于国行标指标要求。同时,应根据行业发展和监管需要,关注相关国家参考品及国行标的研究进展,及时调整质控要求,优化生产工艺,不断完善质量管理体系。

3.3 加强上市后监管是胶体金免疫层析定性检测试剂产业健康有序发展的有效手段

相关监管部门要及时制修订相应的技术审查指导原则、技术指南及国行标,并做好标准宣贯培训,指导和规范相关产品的研发生产^[20];国家监管部门要加大对该类试剂的监管力度,关注企业贯标情况,以期提高产品工艺与质量控制技术水平,促进行业发展。

随着医疗模式和健康理念的转变,胶体金免疫层析试剂这种更成熟、更快捷、更经济的检验技术在即时检验的更多领域发挥了重要作用。提升产品性能、保障质量应从“产、学、研、检、用、管”全流程加强质量控制与评价,多方面协同推进,从而引领该行业稳步向前发展。

参考文献:

- [1] 张莹,冯海,吴秋平,等.胶体金免疫层析技术的研究进展[J].现代生物医学进展,2015,15(12):2349-2351.
- [2] 齐颖颖.免疫胶体金技术及其应用[J].河北省科学院学报,2011,28(4):36-39.
- [3] 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制综合组.联防联控机制综发〔2022〕21号 新冠病毒抗原检测应用方案[S].2022.
- [4] 国务院.国务院令739号 医疗器械监督管理条例[S].2021.
- [5] 国家市场监督管理总局.国家市场监督管理总局令48

号 体外诊断试剂注册与备案管理办法[S].2021.

- [6] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心.2013年第3号 金标类检测试剂注册技术审查指导原则[S].2013.
- [7] 国家药品监督管理局.YY/T1713-2020胶体金免疫层析法检测试剂盒[S].2020.
- [8] 国家食品药品监督管理总局.食药监械管〔2013〕242号 体外诊断试剂分类子目录[S].2013.
- [9] 武晋慧,孟利.免疫胶体金技术及其应用研究进展[J].中国农学通报,2019,35(13):146-151.
- [10] 杨洋,羊国根,杨懿德,等.烟草黑胥病菌胶体金免疫层析快速检测技术的建立与评价[J].安徽农业科学,2022,50(17):128-131,137.
- [11] 时磊,王琛,宋云龙,等.新型冠状病毒侧流免疫层析法研究进展[J].标记免疫分析与临床,2022,29(5):893-896.
- [12] 张稳健,吕欣,黄驰,等.胶体金免疫层析法检测新型冠状病毒IgM/IgG抗体的临床评价与应用[J].病毒学报,2020,36(3):348-354.
- [13] 李雨芮,刘晓雅,张文劲,等.免疫层析技术及应用的研究进展[J].中国兽医学报,2021,41(1):192-198.
- [14] 蔡甜,贾岩,牛英波,等.一种基于量子点标记检测肺炎支原体IgM的免疫荧光层析法[J].中华医院感染学杂志,2019,29(24):3742-3747.
- [15] 张书永.免疫胶体金快速诊断技术的临床应用与质量控制[J].中国医学装备,2013,10(5):37-39.
- [16] Luo K, Kim HY, Oh MH, et al. Paper-based Lateral Flow Strip Assay for the Detection of Foodborne Pathogens: Principles, Applications, Technological Challenges and Opportunities[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 60: 157-170.
- [17] 孙莉,王军.胶体金免疫定性试剂质量评价和问题浅析[J].首都食品与医药,2020,27(2):182-184.
- [18] 周志军,谢勇,岳胜兰,等.抗新型冠状病毒抗体样本盘在其胶体金测试卡质量评价中的应用[J].中国生物制品学杂志,2021,34(1):73-77,83.
- [19] 张波,南铁贵,孙晴,等.免疫检测技术在中药质量快速评价中的应用[J].中国中药杂志,2017,42(3):420-427.
- [20] 刘颖沙,李建科,张琳,等.胶体金制备技术的改进与优化[J].食品与发酵工业,2015,41(11):110-114.

(收稿日期 2023年2月27日 编辑 郑丽娥)